

**ZUR AUTOMATISCHEN BESTIMMUNG
VON 3-METHOXY-4-HYDROXY-MANDELSÄURE
IM URIN**

Günther Mario Gunzelmann

1975

Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Drexel

ZUR AUTOMATISCHEN BESTIMMUNG
VON 3-METHOXY-4-HYDROXY-MANDELSÄURE IM URIN

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günther Mario Gunzelmann

München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Dr. rer. nat. H. Pratzel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Drexel

Dekan:

Tag der mündlichen Prüfung: 5.8.1975



I. Einleitung

1. Zweck und Zielsetzung

2. Darstellung der Bedeutung des Gegenstandes

II. Hauptteil

1. Darstellung der Entwicklung des Gegenstandes

2. Darstellung der

3. Darstellung der

4. Darstellung der

Meinem verstorbenen Vater

5. Darstellung der

6. Darstellung der

7. Darstellung der

8. Darstellung der

9. Darstellung der

III. Schluss

1. Zusammenfassung

2. Zusammenfassung

3. Zusammenfassung

4. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

7. Zusammenfassung

8. Zusammenfassung

9. Zusammenfassung

10. Zusammenfassung

11. Zusammenfassung

12. Zusammenfassung

13. Zusammenfassung

I N H A L T

A. Einleitung

I. Trend zur Automation

II. Entstehung und Bedeutung der HMMS

B. Wahl der Methode

I. Kolorimetrische Verfahren zur HMMS-Bestimmung

II. Handmethode

a) Beschreibung der Methode nach Woitod/Knight und chemische Grundreaktionen

b) Modifikation nach Georges/Small

c) Ergebnisse beider Methoden

III. Automatische Methode - Allgemeines Prinzip

a) Extraktion

b) Analyse

IV. Bestimmung des HMMS-Kreatinin-Quotienten

C. Methodik

I. HMMS-Extraktion

a) Erforderliche Funktionsbestandteile

b) Periphere Geräte

c) Reagenzien u. Lösungen, ihre Vorbehandlung u. Zuführung

d) Arbeitsgang

e) Vor- und Nacharbeiten, Zeitbedarf

II. HMMS-Bestimmung

a) Erforderliche Funktionsbestandteile

b) Periphere Geräte

c) Reagenzien u. Lösungen, ihre Vorbehandlung, Zuführung u. Abscheidung

d) Arbeitsgang

e) Vor- und Nacharbeiten, Zeitbedarf

III. Kreatinin-Bestimmung

D. Vorversuche

I. Allgemeine technische Schwierigkeiten

II. Extraktionsautomat

- a) Zur Wahl der geeigneten Spülflüssigkeit
- b) Zur Wahl der geeigneten Extraktionsmittel
 - 1. Extraktionsmittel
 - 2. Re-Extraktionsmittel
- c) Technische Schwierigkeiten
 - 1. Ventildichtungen
 - 2. Phasentrennung Essigester/Na-Acetat-Lösung

III. HMMS-Analysator

- a) Lichtempfindlichkeit
- b) Technische Schwierigkeiten
 - 1. Unruhige Nulllinie
 - 2. Unregelmäßiger Lauf
 - 3. Verschleppung

E. Ergebnisse

- 1. Spezifität
- 2. Eichkurve
- 3. Reproduzierbarkeit
- 4. Verschleppung
- 5. Ausbeute
- 6. Konzentrationsbereich der HMMS im Urin

F. Diskussion

I. Zu den technischen Schwierigkeiten

II. Zu den Ergebnissen

- a) Zur Spezifität
- b) Zur Reproduzierbarkeit
- c) Zur Ausbeute

G. Zusammenfassung

H. Literatur

I. Anhang

A. Einleitung

I. Trend zur Automation

Laboruntersuchungen gewinnen in Klinik und medizinischer Forschung immer mehr an Bedeutung. Parallel dazu wird ein Trend zur automatischen Analyse sichtbar, der die zeitraubende und mit manchen Fehlern (Wechsel des Laborpersonals, unterschiedliche Arbeitsgeräte etc.) behaftete Handmethode allmählich verdrängt. Automatische Methoden eignen sich vor allem für die Grundlagenforschung, da diese eine große Zahl gleichartiger Bestimmungen (z.B. Kreatinin, Bilirubin, GOT u.a.) benötigt, um statistisch fundierte Aussagen zu erhalten. Die Industrie bietet bereits für eine Reihe wichtiger Serum- und Urinwerte automatische Apparate an, die - bei guter Reproduzierbarkeit und Genauigkeit - eine Frequenz von 20 bis 60 Proben/Std. aufweisen. Das allgemeine Prinzip solcher Analysenautomaten ähnelt einem Baukastensystem, d.h. es ist durch unterschiedliche Anordnung der einzelnen Funktionsbausteine und jeweils andere Reagenzien möglich, verschiedene chemische Reaktionen zu automatisieren. Dies führt schließlich - wie die folgende Arbeit zeigt - zur Entwicklung neuer automatischer Laborbestimmungen.

II. Entstehung und Bedeutung der HMMS

Es bestand die Aufgabe, zu Studienzwecken über die Wirkung von Klimafaktoren auf den Menschen in ca. 2000 Urinproben Relativwerte für den Gehalt an 3-methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (im folgenden kurz HMMS genannt) zu finden. Die HMMS entsteht beim Abbau der Katecholamine (Abb.1); radioaktiv markiertes Adrenalin z.B. wird zu 41,2 % als HMMS im Urin ausgeschieden¹ (der Rest verteilt sich auf 6 weitere Stoffe und 6,8% unverändertes Adrenalin). Die Ausscheidungsmenge erlaubt daher eine Aussage über die Tätigkeit des Nebennierenmarks. Ein Erwachsener scheidet normalerweise etwa 3-5 mg HMMS in 24 Stunden aus¹. Höhere Werte werden z.B. bei Patienten mit Phäochromozytom gefunden. Eine automatische Bestimmungsmethode war bisher nicht bekannt; die große Probenanzahl bot daher Anlaß, ein Handverfahren zu automatisieren.

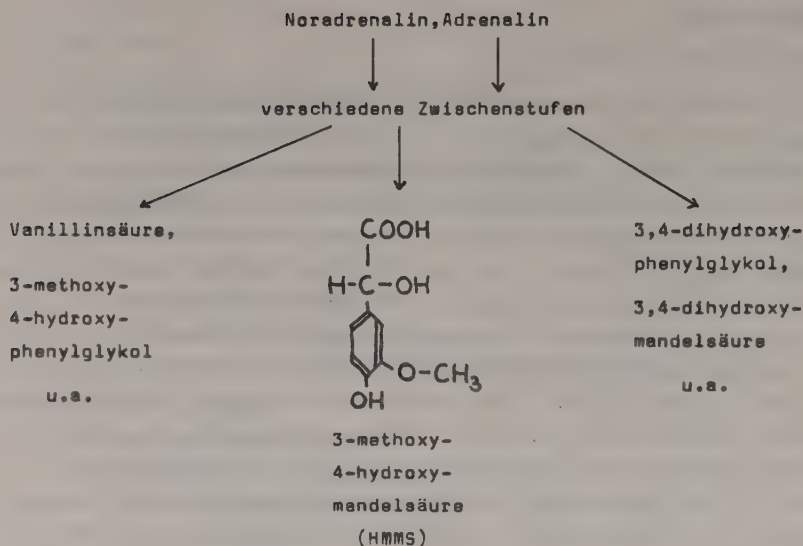


Abb.1 : Abbau der Katecholamine¹ (stark gekürzt)

B. Wahl der Methode

I. Kolorimetrische Verfahren zur HMMS-Bestimmung

In der Literatur² sind mehrere kolorimetrische Verfahren beschrieben; sie beruhen z.T. auf einer Überführung der HMMS in Vanillin, zum anderen auf einer Kondensation mit o-Phenylendiamin; eine dritte Methode nutzt den Phenolcharakter der HMMS zu einer Kupplungsreaktion aus. Letztere Methode wird bevorzugt, weil die Überführung in Vanillin relativ langwierig und das Phenylendiaminverfahren noch nicht ausreichend erprobt ist. Die Prüfung des Zeit- und Reagenzienbedarfs sowie die Ergebnisse einer Versuchsanordnung⁷, die u.a. auf der Basis dieser Methode gebaut worden war, sprachen für die Automatisierbarkeit des Verfahrens; ich entschloß mich daher, die Kupplungsreaktion nach Woitwod/Knight³, modifiziert von Georges/-Smell⁴ zu verwenden.

würden sich Amine umsetzen). - Die entstehende Verbindung ist farbig und wird zuerst mit 15,10 und 5 ml Chloroform und aus diesem mit 10,5,3 und 2 ml 0,1 n NaOH ausgeschüttelt. Die alkalischen Extrakte werden auf genau 20,0 ml gebracht und die Rotfärbung im Photometer bei 510 nm gegen dest. Wasser gemessen. Die Kupplungsreaktion und der HMMS-Chloroform-Komplex sind lichtempfindlich und sollten möglichst bei künstlichem Licht stattfinden bzw. rasch weiterverarbeitet werden.

b) Modifikation nach Georges/Small⁴

Georges und Small ersetzten Äther durch zweimal 10 ml Äthylacetat und wuschen die vereinigten Extrakte anschließend mit 2 ml dest. Wasser. Außerdem verwendeten sie bei der Extraktion der HMMS aus dem Essigester 25,15 und 10 ml Phosphatpuffer (pH: 7,6) statt verdünnter NaOH.

c) Ergebnisse

Woiwod und Knight untersuchten 9 Normalpersonen und 3 Patienten mit Phäochromozytom und fanden im 24-Stunden-Urin Werte zwischen 9,0 und 17,9 mg HMMS für erstere und 12,3 und 25,6 mg für letztere Gruppe. Die Standard-Abweichung bei 14 Standardproben betrug $\pm 11,81 \%$, die Wiederfindungsrate verschiedener Standards in normalem Urin etwa 95 %. Die Extinktionskurve verlief bei 510 nm im gemessenen Konzentrationsbereich linear.

Georges und Small fanden bei 25 Hochdruckpatienten Werte zwischen 2 und 13 mg und bei einem Patienten mit Phäochromozytom 29,4 mg HMMS, jeweils im 24-Stunden-Urin.

III. Automatische Methode - Allgemeines Prinzip

Das Verfahren von Woiwod/Knight wurde leicht modifiziert, in 2 Abschnitte geteilt und diese getrennt automatisiert: Extraktion und eigentliche Bestimmung.

a) Extraktion

Um die HMMS aus Urin zu extrahieren, wurde ein Extraktionsautomat (Prototyp des EXAMAT, Fa. Labotron nach Pratzel⁷) weiterentwickelt. Das allgemeine Prinzip des Apparates beruht auf einer

Verquirlung und anschließenden Trennung von Flüssigkeiten unterschiedlichen spezifischen Gewichts, was durch spezielle Glasgefäße (Dosiergefäße, Mischkölbchen, Phasentrenner), die sich in verschiedenen Etagen befinden (Schwerkraft!) und durch Schläuche miteinander verbunden sind, ermöglicht wird. Die HMMS gelangt dabei von einer wäßrigen Phase in Essigester und hieraus wieder in eine wäßrige Phase.

b) Analyse

Zur eigentlichen Bestimmung der HMMS wurde der HMMS-Analysator nach Pretzel⁷ modifiziert. Das allgemeine Prinzip dieses Geräts beruht auf der kontinuierlichen Mischung und Trennung von Reagenzien in einem geschlossenen System von Glasröhrchen und Schläuchen (Auto-Analyzer-Prinzip). Die Flüssigkeitssäule wird durch Luft in regelmäßigen Abständen segmentiert, eine Schlauchpumpe drückt Reagenzien, Luft und Probe durch den Apparat. Die HMMS reagiert mit der Diazo-Lösung zu einem Farbstoff, der kontinuierlich durch ein Photometer fließt.

IV. Bestimmung des HMMS-Kreatinin-Quotienten

Um die gefundene HMMS-Konzentration in Relation zum Glomerulumfiltrat zu setzen und damit die wahre HMMS-Ausscheidung zu finden, wird in jeder Probe das endogen gebildete Kreatinin bestimmt. Die Kreatinin-Clearance ist der von Inulin zwar unterlegen (hinsichtlich der Gleichmäßigkeit), im Bereich normaler Plasmakonzentrationen (0,8 bis 1,1 mg %) jedoch ausreichend genau⁸. - Zur Messung wird ein Kreatinin-Auto-Analysator (Fa. Technicon) benutzt.

C.Methodik

I.HMMS-Extraktion

a)Erforderliche Funktionsbausteine

Der Extraktionsautomat besteht aus 2 Dosiergefäßen für die Extraktionsmittel, 2 Phasentrennern, die dieselbe Form wie die Dosiergefäße besitzen, und 4 Mischkölbcchen mit Magnetrührern, die gemeinsam durch einen Elektromotor angetrieben werden (Abb. 2 u. 3). Alle Glasgefäße sind über Teflonschläuche dem Arbeitsgang entsprechend verbunden und mit geschliffenen Glasventilen versehen. Ein Programmgeber steuert die Öffnungs- und Schließzeiten der Ventile durch Magnete, sodaß ein Arbeitszyklus entsteht.

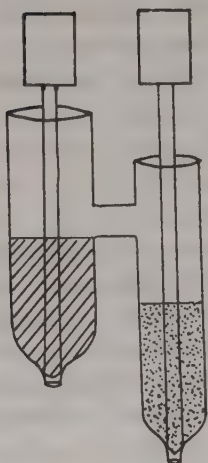


Abb.2: Dosiergefäß bzw.
Phasentrenner

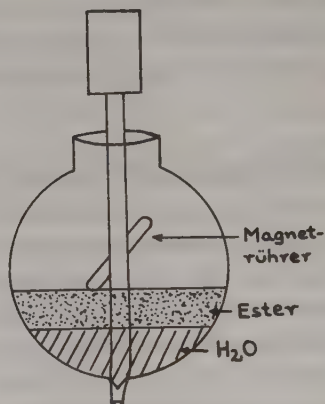


Abb.3: Mischkölbcchen

b) Periphere Geräte

Die Zuführung von Probe, Spülflüssigkeit und Extraktionsmitteln erfolgt mit einer Schlauchpumpe (Fa. Desaga), deren Geschwindigkeit kontinuierlich verstellbar ist. Zur Bereitstellung der Proben- und Aufnahmegefäße für die extrahierte HMMS wurden ein Transportband und Probenentnehmer des "Stuttg. Automat. Analysensystems" (Fa. Bühler, nach SCHEUERBRAND und KELLER) modifiziert und dem Programmgeber unterstellt. Die Reagensgläser sind auf dem Transportband in 20-er Kunststoffblöcken angeordnet.

c) Reagenzien u. Lösungen, ihre Vorbehandlung u. Zuführung

Essigester

Na-Azetat 0,5 %ig

HCl 6 %ig

HMMS-Standard 2 mg% (in dest. Wasser)

Die Reagenzien werden durch eine Schlauchpumpe aus den Vorratsgefäßen in die Dosiergefäße befördert, das gepumpte Minutenvolumen kann durch verschieden weite Pumpschläuche der jeweils erforderlichen Menge angepaßt werden. Schlauchmaterial ist Tygon oder Solvaflex. Da es für Essigester kein auf die Dauer beständiges Schlauchmaterial zum Pumpen gibt, wird er über eine Verdrängungsflasche zugeführt. Um die Pumpe während des Füllens der Flasche nicht unterbrechen zu müssen, wurde folgende Anordnung verwendet (Abb. 4):

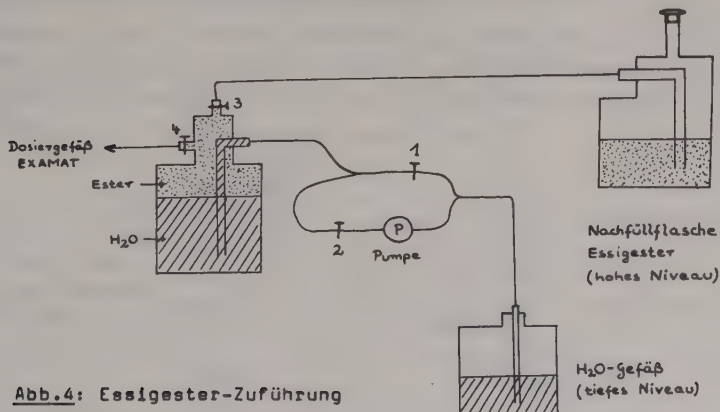


Abb. 4: Essigester-Zuführung

(zu Abb.4): Bei normalem Lauf (Verdrängungsflasche mit Ester gefüllt) sind die Hähne 1 und 3 geschlossen, die Hähne 2 und 4 geöffnet. Dadurch wird Wasser in die Verdrängungsflasche gedrückt und Ester in das Dosiergefäß. Muß Ester nachgefüllt werden, werden nacheinander Hahn 3 geöffnet, Nr.4 geschlossen und Nr.1 geöffnet (Hahn 2 bleibt offen); ferner wird der zum Wassergefäß führende Schlauch an eine Wasserstrahlpumpe gelegt, wodurch das Wasser aus der Verdrängungsflasche gesaugt und Ester nachgezogen wird. Die gegensinnig laufende Pumpe bedeutet kein Hindernis, da die Wasserstrahlpumpe stärker ist und hauptsächlich über den offenen Hahn 1 saugt.

Nach beendeter Füllung werden die Hähne 1 und 3 geschlossen und Nr.4 wieder geöffnet. Während der Füllung muß das Ester-Dosiergefäß etwa 2-3 mal manuell nachgefüllt werden.

d) Arbeitsgang (Abb.5)

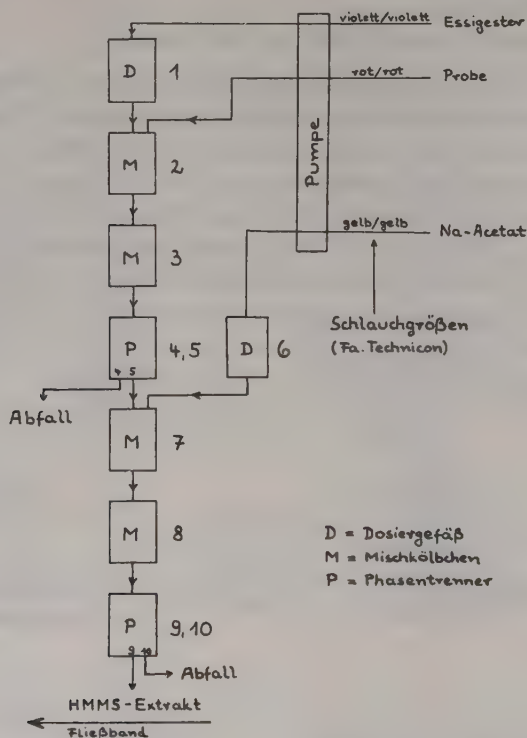


Abb.5 : Extraktionsautomat (Schema f. Darstellung d. Arbeitsgangs)

Nachdem zunächst Spülflüssigkeit angesaugt wurde, wird einem Reagenzglas, das auf dem Fließband steht und ca. 10 ml Urin enthält, vom Probennehmer eine konstante Menge (7,6 ml) entnommen, mittels der Schlauchpumpe in Kölbchen 2 gebracht und anschließend wieder eine kleinere Menge Spülflüssigkeit zugeführt (HCl, insgesamt 1,6 ml). Die Probennehmernadel verweilt - bei kontinuierlich seugender Pumpe - 5:45 min. in der Probe und 1:15 min. in der Spülflüssigkeit. Bereits zu Beginn der Probenentnahme öffnet das Ventil von Dosiergefäß 1 und läßt etwa 20 ml Essigester in Kölbchen 2 fließen. Es bilden sich 2 Phasen, da sich der Ester nur minimal mit Wasser mischt.

Nach 7 min., d.h. zu einem Zeitpunkt, da bereits wieder Spülflüssigkeit zuläuft und somit eine Vermischung der einzelnen Proben ausgeschlossen ist, gelangen die 2 Phasen in Kölbchen 3 und nach weiteren 7 min. (während in Kölbchen 2 schon die nächste Probe eingelaufen ist) in den Phasentrenner 4 und 5. Der physikalisch leichtere Essigester fließt in Nr.5, da Nr.4 schon die schwerere wäßrige Phase (Urinreste) aufgenommen hat. Nach gewisser Zeit öffnet zunächst das Ventil von Kölbchen 5 und übergibt den Ester, in dem nun die HMMS gelöst ist, an Kölbchen 7, in das kurz vorher aus Dosiergefäß 6 ca. 5 ml Na-Azetat geflossen sind. Der Rückstand aus Nr.4 (Urin und etwas Essigester) fließt in eine Abfallflasche.

Nach jeweils 7 min. fließt die Probe weiter in Kölbchen 8 und in den Phasentrenner 9 und 10, wo wiederum zunächst der Essigester aus Nr.10 in ein Sammelgefäß läuft; die Na-Azetat-Lösung mit der extrahierten HMMS wird von einem Reagenzglas auf dem Fließband, das sich ja ebenfalls alle 7 min. weiterbewegt, aufgenommen (ca. 4 ml). Die (beschrifteten) Reagenzgläser sind auf dem Fließband 2-reihig in 20-er Kunststoffblöcken angeordnet, sodaß sich keine Schwierigkeiten mit der richtigen Zuordnung der Proben ergeben (Abb.6).

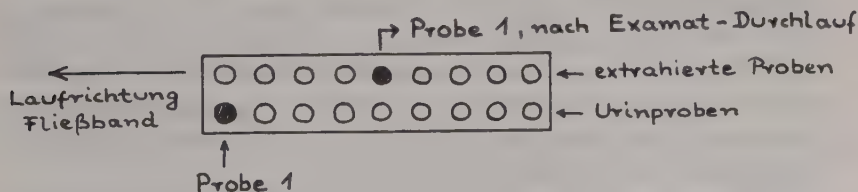


Abb.6 : Reagenzglasblock (von oben gesehen)

Gleiche Proben sind gegeneinander um 5 Plätze verschoben. Noch bevor ein Probenblock ganz durchgelaufen ist, kann der nächste auf das Fließband gestellt werden, sodaß keine Unterbrechung des Arbeitszyklus' nötig ist. Auf jede Urinprobe folgt ein Reagensglas mit Wasser, d.h. in einem Kunststoffblock befinden sich nur 5 Urinproben. Nach jeweils 20 Urinproben folgen zwei 2 mg%-Standards, ebenfalls durch Wasser getrennt.

Ein durchgelaufener Block wird manuell vom Transportband genommen; die Urinreste werden verworfen, die Extrakte eine Nacht offen stehen gelassen (zur Verdunstung einer dünnen Schicht Essigesters) und am nächsten Tag der Reihe nach in kleine Gefäße (2 ml) für die HMMS-Bestimmung umgefüllt. Will man die Bestimmung erst später ausführen, können die Proben vor dem Umfüllen etwa 5 Tage im Kühlschrank (4-6 Grad Celsius) aufbewahrt werden; um Konzentrationsänderungen zu vermeiden, sollten die Röhrchen jedoch einen Plastikfilm-Überzug erhalten. Benötigt man die Extrakte noch am selben Tag, können die Esterreste mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und etwaige letzte Spuren (Geruch!) mit einem schwachen Preßluftstrahl beseitigt werden.

e) Vor- und Nacharbeiten, Zeitbedarf

Bevor der Apparat in Betrieb gesetzt werden kann, müssen die Reagenzien bereitgestellt und nachgefüllt sowie die Abfallflaschen geleert werden; ferner sind die Reagensgläser zu beschriften, Urin und Wasser einzufüllen und im Kunststoffblock auf das Transportband zu stellen. Diese Arbeiten sind auch während des Arbeitszyklus' durchzuführen.

Zum Vorspülen werden dann zunächst 5 Wasserproben durchgeschickt und dabei die Funktion des Apparates geprüft (Durchgängigkeit der Pumpschläuche, Dichtigkeit der Ventile, richtiges Öffnen und Schließen etc.). Danach beginnt der Probendurchlauf.

Ist die letzte Probe durchgelaufen, wird der Apparat durch 6 nachfolgende Wasserproben gereinigt und anschließend, wenn die Probennehmer-nadel gerade wieder in die Spülflüssigkeit getaucht ist, ausgeschaltet. Die Schlauchpumpe wird ausgehängt, bei der Essigesterzuführung jedoch zuvor die Hähne 1 und 2 geschlossen (Rücklaufsicherung). - Eine stärkere Verschmutzung, die manchmal in den Kölbchen 2, 3 und 4 auftritt und aus abgelagerten Urinbestandteilen (vor allem Oxalaten) besteht, kann mit 40%iger Schwefelsäure entfernt werden.

Für diese Vor- und Nacharbeiten (einschließlich Wasserproben) wird jeweils eine knappe Stunde benötigt.

II. HMMS-Bestimmung

a) Erforderliche Funktionsbestandteile

Zum HMMS-Apparat gehören zwei 1,5 ml und fünf 5 ml lange Glas-Mixschlangen (lichte Weite ca. 4 mm), die durch Glasröhrchen (gleicher Durchmesser) und zwischengeschaltete Reagenzien-Zuführer und -Abscheider miteinander verbunden sind. Form und Lage der einzelnen Bausteine sind für richtiges Funktionieren entscheidend (Abb. 7-10, s. ferner Kapitel über Vorversuche). Zum Schutz liegt die ganze Glaskonstruktion in einem flachen Kästchen (Abmessungen ca. 40 mal 30 mal 5 cm), das mit einer abnehmbaren, durchsichtigen Scheibe bedeckt ist. Die Zuführungen für die Reagenzien, zum Photometer und die Ableitungen der Abscheider führen an den Seiten nach außen.



Abb.7: Glasschlange (horizontal zu lagern!)

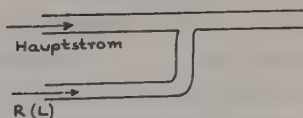


Abb.8: Reagenzien- und Luftzuführung (immer von unten!)



Abb.9: Phasentrenner (gleichzeitig 1. Luftabscheider)



Abb.10: CHCl₃-Abscheider und 2. Luftabscheider

b) Periphere Geräte

Die Zuführung von Probe, Spülflüssigkeit, Luft und Reagenzien erfolgt auch hier mit Schlauchpumpe (Fa. Ismatec, kontinuierliche Geschwindigkeitsverstellung) und Probennehmer (Fa. Technicon, Modell Sampler II). Letzterer wurde leicht modifiziert: Die Proben- und Spülflüssigkeitsansaugdauer (d.h. die Probenfrequenz) wird nicht mehr durch einlegbare Kupplungswahlscheiben relativ starr variiert, sondern kann mit einem

speziellen Impulsgeber (Fa.Schleicher) sehr genau und unabhängig voneinander eingestellt werden.-

Der Farbstoff wird mit einem Mikro-Durchfluß-Kolorimeter (Fa.Labotron) in einer 2 mm-Glasküvette gemessen und die Photozellenspannung über einen Verstärker (Fa.Beckman, Modell LV 193) an einen Schreiber (Fa.Hartmann u.Braun) weitergegeben, der die Farbstoffintensität graphisch aufzeichnet.

c) Reagenzien u. Lösungen, ihre Vorbehandlung, Zuführung u. Abscheidung

p-Nitranilin-Lösung (1 g p-Nitranilin in 6 ml konz. HCl auflösen, mit dest. Wasser auf 5 l verdünnen, filtrieren)

Na-Nitrit 0,01 %ig

Amidosulfonsäurelösung (= Ammoniumsulfaminatlösung) 0,005 %ig

Pottasche 10 %ig

NaOH 0,2 n

Chloroform

HMMS-Standard 0,5 mg% (12,5 ml 4 mg%-Standard wird zu 5 ml 10 %iger Na-Azetat-Lösung gegeben und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt)

Die meisten dieser Lösungen können einfach aus Vorratsgefäßen mittels der Schlauchpumpe entnommen werden; NaOH und Chloroform jedoch müssen vor der Zuführung weitgehend entgast sein, da sonst zu häufig Luftbläschen in die Photometerküvette gelangen und die Ergebnisse stark verfälschen.

Die NaOH wird bei der Herstellung entgast: 5 l dest. Wasser werden bis zum Kochen erhitzt (Quarztauchsieder) und anschließend 40 g NaOH (kurz vorher abgewogen) langsam dem heißen Wasser zugegeben; dann wird das Gefäß gekühlt und gleichzeitig an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen; zum Schluß füllt man mit dest. Wasser wieder auf 5 l auf.- Die NaOH-Vorratsflasche, woraus die Schlauchpumpe saugt, ist mit einem CO_2 -abweisenden Natron-Asbest-Filter versehen.

Die Chloroform-Entgasung wurde, nach unbefriedigenden Versuchen einfacherer Art, mit einer etwas aufwendigen Apparatur, die auch den Chloroform-Abfluß mit einschließt, gelöst (Abb. 11). Die Wasserstrahlpumpe entgast bei offenen Hähnen 3 und 4 Wasser und Chloroform in sämtlichen Gefäßen. Auch das abfließende Chloroform muß entgast werden, weil während des Arbeitsgangs die Schlauchpumpe in der Abflußflasche einen Unterdruck erzeugt und dabei ausperlende Luftblasen zu Unregelmäßigkeiten der Chloroform-Abscheidung im Apparat führen.

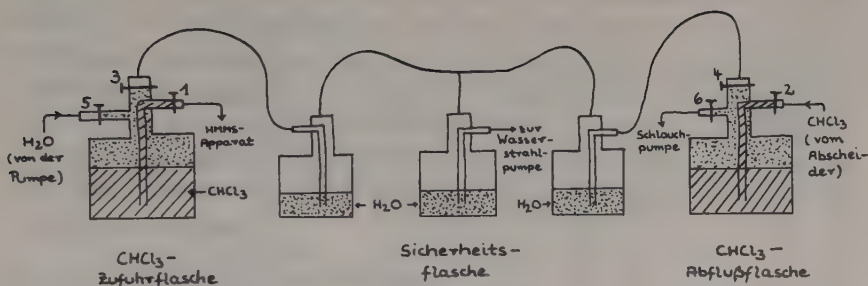


Abb.11: CHCl_3 -Zufuhr und -Abfluß

Die obenstehende Anordnung gewährleistet, daß nach Abtrennen der Wasserstrahlpumpe keine Luft, sondern nur entgasetes Wasser in die Verdrängungsflaschen zurückfließt. Die Sicherheitsflasche verhindert Beimengungen von Leitungswasser und Schlauchartefakten. Die Hähne 1 und 2 sind aus Teflon, die übrigen aus Glas. Die Öffnung in Hahn 1 hat die Form einer Düse, die das durchfließende Chloroform in feine Tröpfchen zerteilt (Freisetzen eingeschlossener Luftbläschen) und damit bereits während des Nachfüllens zu kontinuierlichem Ausgasen führt.

Die Zu- und Abführungsschläuche bestehen aus Teflon, Perbunan oder PVC, bei Chloroform aus Chloroform-beständigem Material (Acidflex, Isoversinic, Viton), während das Pumpschlauchmaterial meist Tygon oder Solvaflex ist; nur die 3 Pumpabflußschläuche sollten ebenfalls Chloroform-beständig sein, weil hier Spuren dieser Chemikalie nicht zu vermeiden sind.

d) Arbeitsgang (Abb.12)

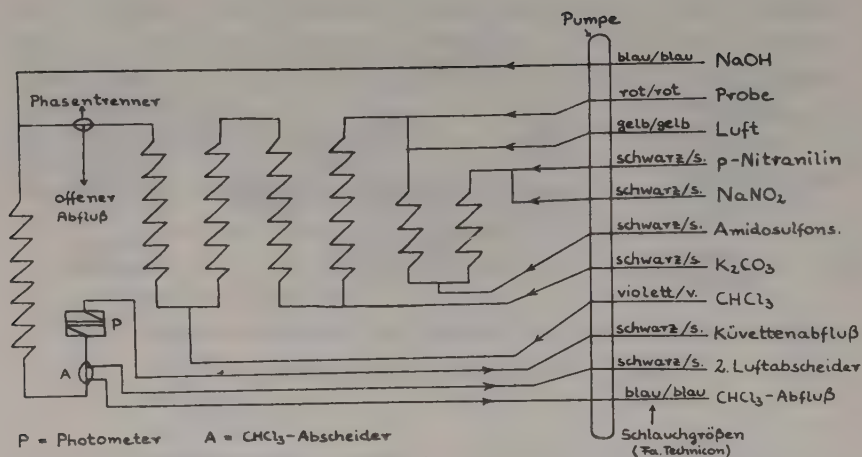


Abb.12: HMMS-Analysator (Schema zur Darstellung d.Arbeitsgangs)

Der Probennehmer saugt aus einem Plastikbecher (Vol.ca. 2 ml) etwa 1 ml Probe und mischt sie in einer kurzen Glasschleife (1,5 ml) kontinuierlich mit dem Reagens. Dieses besteht aus p-Nitranilin, das mit der Na-Nitrit-Lösung in einem kurzen Mixer diazotiert und anschließend mit Luft segmentiert wurde (Amidosulfonsäurezugabe nach der Diazotierung zerstört in einem weiteren kurzen Mixer das überschüssige Nitrit). Das Proben-Reaktionsgemisch, weiterhin mit Luft segmentiert, wird nun mit Pottasche (=K₂CO₃) alkalisiert; nach Passieren von 2 langen Mixern (5 ml) entsteht das Farbmaximum. Der Farbstoff wird mit Chloroform in einem langen Mixer extrahiert. In einem speziellen T-Stück (Phasentrenner, Abb.9) wird die wäßrige Phase zusammen mit der Luft abgeschieden, die Chloroform-Lösung anschließend mit der NaOH segmentiert und der Farbstoff in einem langen Mixer in die Laugenphase überführt. Nach Abscheidung des Chloroforms und etwaiger Luftreste (Abb.10) fließt die NaOH durch die Photometer-Küvette, wo die Farbstoff-Extinktion bei 510 nm gemessen wird. Als Leerwert, d.h. Basislinie der Extinktionskurven, dient die nachfolgende NaOH mit der Spülflüssigkeit (dest. Wasser).

Alle Reagenzien, die Luft sowie der Abfluß des Chloroforms und des Luftabscheiders vor der Küvette laufen durch die Schlauchpumpe (Schrittmotoreneinstellung 100%), nur mit dem Abfluß der wäßrigen Phase ist das System offen. Die Probenfrequenz beträgt 3:09 min.; dabei verweilt die Probennehmeradel 1:27 min. in der Probe und 1:42 min. in der Spülflüssigkeit. Auf dem Probenteller finden 40 Becher Platz; nach jeweils 16 Proben folgt ein 0,5 mg%-Standard, nach jeweils 8 Proben ein Gefäß mit dest. Wasser; die durchgelaufenen Proben können laufend durch neue ersetzt werden, ohne daß der Arbeitsgang unterbrochen werden muß.

e) Vor- und Nacharbeiten, Zeitbedarf

Wie beim Extraktionsautomaten müssen auch hier Reagenzien und Proben bereitgestellt werden. Gleichzeitig wird etwa 15 min. lang Chloroform entgast. Dann läßt man den HMMS-Analysator mit allen Reagenzien und Spülflüssigkeit etwa 20 min. laufen und prüft die Funktion des Apparates (gleichmäßige Luftsegmentierung, durchgängige Pumpschläuche, Luftabscheidung, Chloroform-System etc.). Eine markierte Flüssigkeit (Methylenblau) benötigt ca. 13 min., um von der p-Nitranilin-Vorratsflasche bis zur Küvette (=längster Weg im System) zu gelangen.- Danach kann der Probendurchlauf beginnen.

Nach der letzten Probe läßt man die Nadel ca. 5 min. Spülflüssigkeit ansaugen, anschließend werden zum Reinigen und Durchspülen alle Reagenzien-Zuführungsschläuche (außer Chloroform und NaOH) in ein Gefäß mit dest. Wasser gelegt. Nach etwa 20 min. wird die Pumpe abgeschaltet und ausgehängt sowie die Hähne des Chloroform-Zu- und Abführungssystems (Abb.11) geschlossen. Alle peripheren Geräte können ausgeschaltet werden, Photometer und Verstärker jedoch bleiben durchgehend geheizt, um jederzeit wieder schnell einsatzbereit zu sein.- Der Standard ist, wie auch der bei der Extraktion verwendete, im Kühlschrank aufzubewahren.

Für diese Vor- und Nacharbeiten wird jeweils eine gute halbe Stunde benötigt.

III. Kreatinin-Bestimmung

Von jeder Probe, die für den Extraktionsautomaten bereitgestellt wird, werden ca. 2 ml für die Kreatinin-Bestimmung abgezweigt. Der Apparat kann mit denselben peripheren Geräten (Schlauchpumpe, Probennehmer mit Impulsgeber, Photometer, Verstärker, Schreiber) betrieben werden

wie der HMMS-Analysator. Das Umstecken der einzelnen Schlauchverbindungen dauert etwa eine Viertelstunde. Die Probenfrequenz beträgt 3:03 min., der Farbstoff wird in einer 2 mm-PVC-Küvette bei 506 nm gemessen; Vor- und Nacharbeiten sowie der dazu nötige Zeitbedarf entsprechen dem HMMS-Analysator.

D. Vorversuche und deren Ergebnisse

I. Allgemeine technische Schwierigkeiten

Schlauchverbindungen

Die Industrie bietet Teflon- und Metallnippel an, um Pump- und andere Schläuche miteinander zu verbinden. Der Nachteil liegt im relativ hohen Preis solcher Verbindungsstücke, die doch in größerer Anzahl gebraucht werden. Ich verwandte daher mit gutem Erfolg gewöhnliche kurze PVC- oder Perbunanschläuche (mit etwas größerem Durchmesser als die zu verbindenden Schläuche), die über die 2 Schlauchenden geschoben werden (Abb.13). Zum Verschweißen von PVC-Schläuchen befeuchtet man die Berührungsflächen mit Cyclohexanon oder Tetrahydrofuran; bei Chloroformbeständigen Schläuchen (Acidflex, Teflon) wird die Verbindung mit einer Klemme, die über das kurze Verbindungsstück geschoben wird, fixiert (Abb.14).

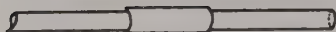
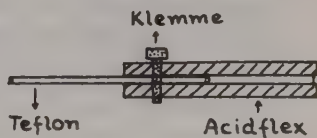


Abb.13: Schlauchverbindung
(PVC, Perbunan)



Querschnitt

Abb.14: Verbindung bei CHCl_3 -
beständigen Schläuchen

II. Extraktionsautomat

a) Zur Wahl der geeigneten Spülflüssigkeit

Woiwod und Knight benützten für die Extraktion eine NaCl-gesättigte Salzsäure-Lösung, um eine bessere Trennung zu ermöglichen (Dichteunterschied), ferner, um den pH-Wert herabzusetzen und dadurch das Dissoziationsgleichgewicht in Richtung undissoziierte HMMS (in Essigester löslich) zu verschieben. Im Extraktionsautomaten sollte sie zusätzlich als Spülflüssigkeit für den Probenzuführungsschlauch dienen. Es stellte sich jedoch heraus, daß eine gesättigte Lösung wegen ihrer Tendenz zum Auskristallisieren im offenen Entnahmegefäß ungeeignet ist. Ich versuchte es daher mit verschiedenen Konzentrationen reiner HCl-Lösung und probeweise auch mit Wasser. Es zeigte sich, daß die Ausbeute mit saurer werdendem pH ansteigt (Abb.15). Nachteilige Folgen durch die geringere Salzkonzentration wurden nicht untersucht, dürften aber nicht erheblich sein.

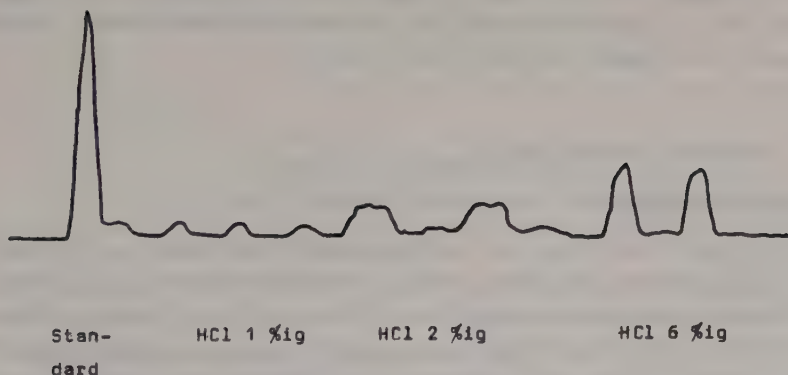


Abb.15 : Extinktionskurve
zur Prüfung einer geeigneten Spülflüssigkeit

b) Zur Wahl der geeigneten Extraktionsmittel

1. Extraktionsmittel

Woiwod und Knight benutzten als Extraktionsmittel Äther, Georges und Small Äthylester. Ich versuchte zunächst, die HMMS in Chloroform zu lösen, weil der Extraktionsautomat ursprünglich in einem Arbeitsgang auch die 17-Ketosteroide aus Urin extrahieren sollte und dies mit Chloroform möglich ist⁷. Es stellte sich jedoch heraus, daß die HMMS kaum in die Chloroform-Phase übergeht. Daher wurde der Apparat umgebaut und Äthylester als Extraktionsmittel angewandt. Dies hat sich gut bewährt.

2. Re-Extraktionsmittel

Um die HMMS wieder aus der organischen Phase zu extrahieren, benutzten Woiwod und Knight stark verdünnte NaOH, Georges und Small Phosphatpuffer (pH: 7,6). Ich probierte es zunächst mit NaOH, dann mit Pottaschelösung (10%). Beide Lösungen sind für die Extraktion gut geeignet, jedoch stört das stark basische Milieu bei der HMMS-Bestimmung. Mit einer schwächer basischen Lösung (Na-Azetat) wurde ein guter Kompromiß zwischen Extraktion und Bestimmung erreicht. Es scheint, daß die Reaktion der HMMS mit dem sauren Diazo-Reagens im HMMS-Apparat bei stark basischem Milieu der Probe unzureichend abläuft.

Es wurden 0,1 - 0,5 %ige Na-Azetat-Lösungen ausprobiert, die Extinktion war in allen Fällen ziemlich gleichmäßig, der Unterschied zu Pottasche kommt jedoch deutlich heraus (Abb. 16).

c) Technische Schwierigkeiten

1. Ventildichtungen

Die Ventildichtungen für die Glasstäbe in den einzelnen Kölbchen bestanden zunächst aus kurzen Perbunan-Schlauchstückchen, die die Abflußöffnungen innen auskleideten. Es stellte sich jedoch heraus, daß auch Perbunan auf die Dauer nicht Essigester-beständig ist: nach einigen Betriebstagen fingen die Dichtungen an, unregelmäßig zu quellen und wurden daraufhin durchlässig. Da kein weiteres beständiges elastisches Schlauchmaterial bekannt ist, wurden die Kölbchen mit geschliffenen Glasventilen versehen, die nun einwandfrei abdichten.

St. = HMMS-Standard 20 mg/l

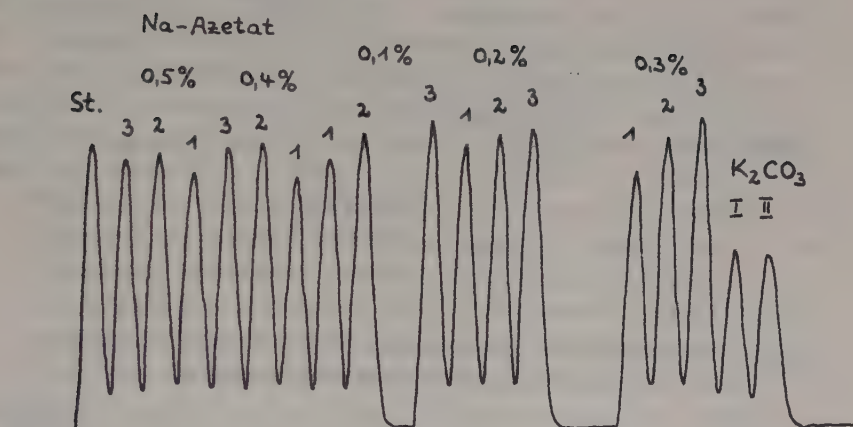


Abb.16: Extinktionskurve
zur Prüfung eines geeigneten Re-Extraktionsmittels

2. Phasentrennung Essigester/Na-Azetat-Lösung

Bei der Abtrennung der (leichteren) Ester-Phase von der (schwereren) wäßrigen Laugenlösung im Phasentrenner Nr. 9 und 10 blieb immer eine ca. 1-2 mm dicke Esterschicht auf dem wäßrigen Extrakt liegen. Die Ursache dafür lag in der unterschiedlichen Oberflächenspannung, die Ester und Wasser gegenüber der Glaswandung besitzen (Abb.17). Dazu kam, daß beim Einströmen der 2 Phasen in das Gefäß Nr.9 der später zufließende Ester auch bei geringer Fließgeschwindigkeit etwas von der wäßrigen Phase in Gefäß Nr. 10 herausdrückte.

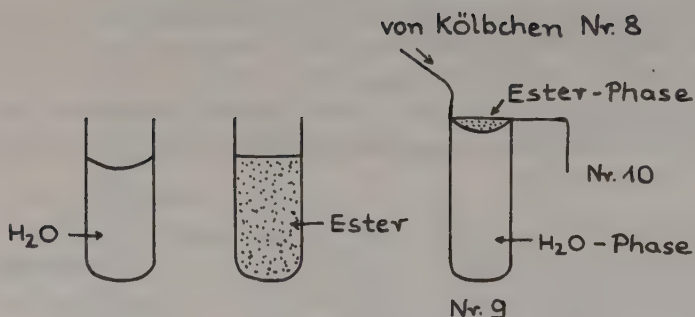


Abb.17: Unterschiedliche Oberflächenspannung der Ester- und Wasserphase und ihre Bedeutung für die Phasentrennung

Versuche mit Detergentien (Brij-Lösung, Anbringen von Silicon-Spray (Fa. Huth, Starnberg) innen am Gefäß Nr.9) brachten keine wesentlich bessere Abtrennung bzw. wurden nach jedem Arbeitszyklus mit weggespült. Es wird daher jetzt auf eine sofortige vollständige Abtrennung im automatischen Arbeitsablauf verzichtet und die Proben, wie in der Methodik angegeben, nachbehandelt.

III. HMMS-Analysator

a) Lichtempfindlichkeit

Laut Georges/Small⁴ ist die entstehende Färbung lichtempfindlich. Bei probeweiser Verdunkelung des Gerätes konnte jedoch kein Unterschied in der Extinktion gleicher Standard-Proben festgestellt werden.

b) Technische Schwierigkeiten

1. Unruhige Nulllinie

Um einwandfreie Peakhöhen ablesen zu können, muß sich die Nulllinie nach Arbeitsbeginn auf einen gleichbleibenden Wert einpendeln (Background). Dies war anfangs nicht der Fall. Trotz des Luftabscheiders perlten im Zuführungsschlauch der Küvette immer wieder kleinste Luftbläschen aus, die sich nach und nach in der Küvette festsetzten und den kontinuierlichen Probenfluß und vor allem die Auswertung erheblich störten. Nach symptomatischen Abhilfeversuchen (Durchspülen mit dest. Wasser, Einleiten einer großen Luftblase, die die kleinen mitnahm), die jeweils nur kurzfristige Besserung brachten, wurden systematisch folgende Einzelexperimente durchgeführt:

- Erhitzen der NaOH-Chloroform-Phase auf 40 Grad Celsius (Wasserbad)
- Erhitzen der NaOH-Phase nach Abscheidung des Chloroforms auf verschiedene Temperaturen zwischen 40 und 70 Grad Celsius
- Erhitzen der NaOH-Phase wie vorher, anschließend Kühlung in einer V 2a - Stahlschleife (Eisbad) kurz vor der Küvette
- Alleinige Kühlung in der Stahlschleife kurz vor der Küvette

Grundgedanke dieser Experimente war, die in den Chemikalien gelöste Luft entweder durch Erhitzen auszutreiben oder durch Kühlung nicht ausperlen zu lassen. Die Versuche führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg.

- Höherlegen des HMMS-Gerätes einschließlich des Luftabscheider-Abflusses über das Niveau der Küvette, um etwaigen Unterdruck zu vermeiden (Ausperlen!)
- Einführen eines 2. Luftabscheiders kurz vor der Küvette
- Entgasen von Chloroform in der Vorratsflasche 30 min. vor Beginn des Arbeitszyklus'
- Entgasen der NaOH zunächst ebenfalls in der Vorratsflasche, der Effektivität wegen (sehr viel höherer negativer Druck oder höhere Temperatur nötig als bei Chloroform) schließlich schon bei der Herstellung

Diese Versuche brachten eine entscheidende Verringerung der Luftblasen und damit eine nahezu konstante Nulllinie. Weitere Verbesserungen (Entgasen auch des Abflusses, Verdrängungsflaschen) führten zur jetzigen Methodik.

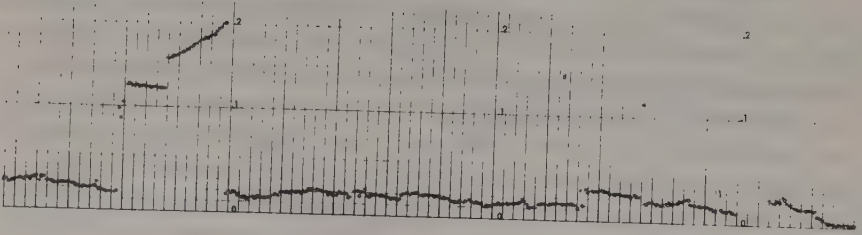


Abb.18 : Unruhige Nulllinie

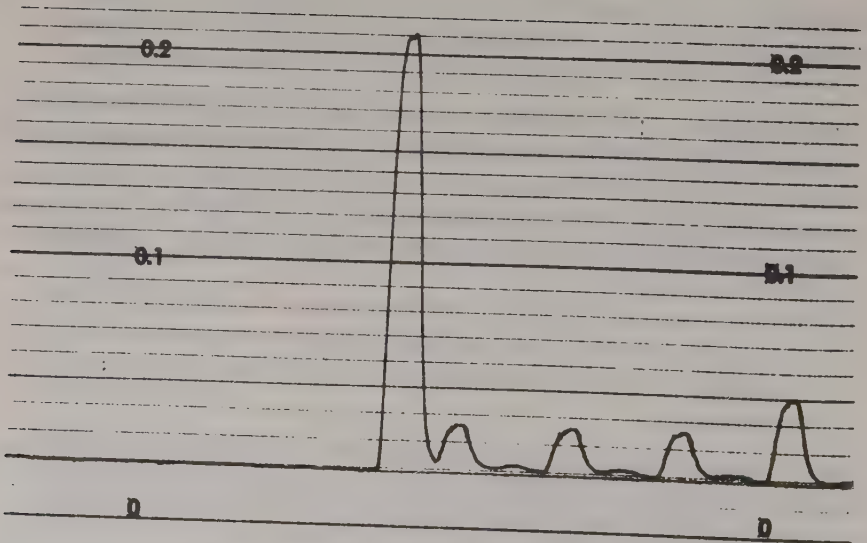


Abb.19 : Nulllinie nach den Verbesserungen

2. Unregelmäßiger Lauf

Das System der miteinander verbundenen Glasstäbchen, Glasspiralen und Abscheidevorrichtungen reagiert recht empfindlich auf Druckschwankungen und muß daher möglichst gleichmäßig horizontal liegen. Reagenzien und vor allem die komprimierbare Luft werden - älteren Versuchen entsprechend⁹ - von unten in den Hauptstrom eingeleitet, um hydrostatische Drücke auszugleichen.

Innerhalb des Systems selbst sollte die Pumpe, an die ja auch diverse Abflüsse zugeschaltet sind, einen kontinuierlichen Druck bzw. Zug garantieren. Trotzdem traten manchmal in den Glasspiralen rhythmische Geschwindigkeitsänderungen des segmentierten Flüssigkeitsstroms auf ("Unwucht"), die zu unterschiedlichen Reaktionszeiten der Probe mit den Reagenzien führte. Ursache dafür war die - u.a. durch die Größe des Luftzuführungsschlauches bestimmte - Segmentlänge, die nicht der Länge einer vollen Spiralenwindung entsprechen darf. Abhilfe brachte eine andere Schlauchgröße.

Der einzige nach außen offene Abfluß des Systems dient u.a. dem Druckausgleich (genau gleiche Fördermengen über längere Zeit sind nicht möglich, z.B. infolge der ungleichen Abnutzung verschieden großer Pumpschläuche); er führte aber selbst zu Druckschwankungen. Ursache war die Oberflächen- und Abrißspannung der einzelnen Tropfen am freien Ende des Abflußschlauches. Ich legte darauf das Schlauchende unter den Flüssigkeitsspiegel des Abflußgefäßes auf etwa gleiches Niveau mit dem Phasentrenner (Überlaufgefäß verwenden, Spiegel muß etwas höher als das System sein); dadurch wurde die Druckverteilung gleichmäßiger.

3. Verschleppung

Die Verschleppung des HMMS-Analysators hängt von vielerlei Faktoren ab: Größe des Totraums, Strömungsgeschwindigkeit, Viskosität der Flüssigkeiten, Segmentierung u.a. Für die Praxis wichtig war davon lediglich der Totraum der Phasentrenner und Luftabscheider - der möglichst klein, aber konstant sein muß - und die fehlende Segmentation nach der Chloroform-Abscheidung. Mehrere Versuche mit eigens hergestellten Formen (endgültige s. Abb. 9 und 10) und einer Küvettenzuführung mittels eines sehr kleinen Teflonschlauches (Durchmesser 1/2 mm) setzten die Verschleppung so herab, daß sie praktisch nicht mehr in Erscheinung tritt.

E. Ergebnisse

1. Spezifität

Folgende Substanzen, die u.a. regelmäßig oder gelegentlich im Urin vorkommen, wurden jeweils 0,25 millimolar in Na-Azetat gelöst und direkt im HMMS-Analysator gemessen sowie mit äquimolarem HMMS-Standard verglichen:

Salizylsäure
p-Hydroxy-benzoesäure
3,4 - Dihydroxy-DL-mandelsäure
Phenylbrenztraubensäure
4 - Hydroxy- 3 - methoxy-zimtsäure
5 - Hydroxy-indol- 3 - essigsäure
Vanillinsäure
m-Hydroxy-benzoesäure
3,4 - Dimethoxy-phenylessigsäure
t,p-Hydroxy-zimtsäure

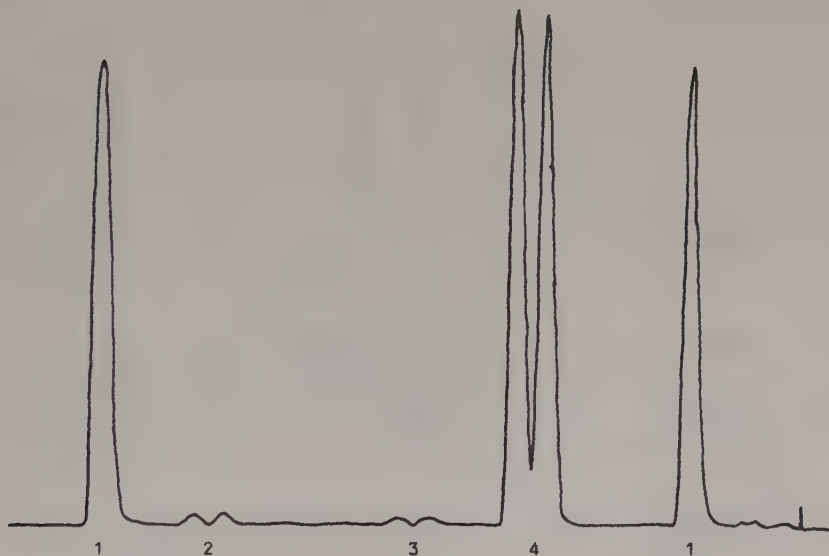
Wie aus Abb.20 ersichtlich ist, zeigen Vanillinsäure und - sehr gering - p-Hydroxy-benzoesäure und 4-Hydroxy-3-methoxy-zimtsäure eine Extinktion im gemessenen Wellenlängenbereich (510 nm).

In - früher verwendeter - Pottasche gelöst wurden außerdem folgende Substanzen gemessen (bei 511 nm):

Anthranilsäure
Nikotinsäure
5 - Hydroxy- 3 - indolylessigsäure
Tryptamin
3 - Hydroxy-mandelsäure
Xanthurensäure
Urocaninsäure
p-Cresol
Homovanillinsäure
Brenzkatechin
3 - Hydroxy-anthranilsäurehydrochlorid
3 - Hydroxy-tyraminhydrochlorid
4 - Amino-benzoesäure
2 - Hydroxy-phenylessigsäure
3 - Hydroxy-phenylessigsäure
4 - Hydroxy-phenylessigsäure

L-Histidin
 DL-Kynurenin
 DL-Noradrenalin
 Phenol
 Indoxylsulfat- K^+
 Kynurensäure

Von diesen Substanzen ergab nur Phenol eine größere Extinktion (ca. 12 % vom äquimolaren HMMS-Standard-Ausschlag).



1 = HMMS-Standard 20 mg/l
 2 = p-Hydroxy-benzoesäure
 3 = 4-Hydroxy-3-methoxy-zimtsäure
 4 = Vanillinsäure

Abb. 20 : Extinktionskurven z. Spezifität

2. Eichkurve

Ein Beispiel für eine Eichkurve (zu einem bestimmten Zeitpunkt) ist unten dargestellt (Abb.21); sie gilt für das ganze System, d.h. der ihr zugrundeliegende Standard lief durch Extraktionsautomat und HMMS-Analysator. Die Verschleppung wurde nicht mit einbezogen (Auswertung nur des jeweils 1. Peaks, Abb.22). Die Kurve hängt von den äußeren Versuchsbedingungen ab (z.B. Abnutzungsgrad der Pumpschläuche, Extraktionsausbeute) und muß öfters neu bestimmt werden; sie ändert sich allerdings nur geringfügig.

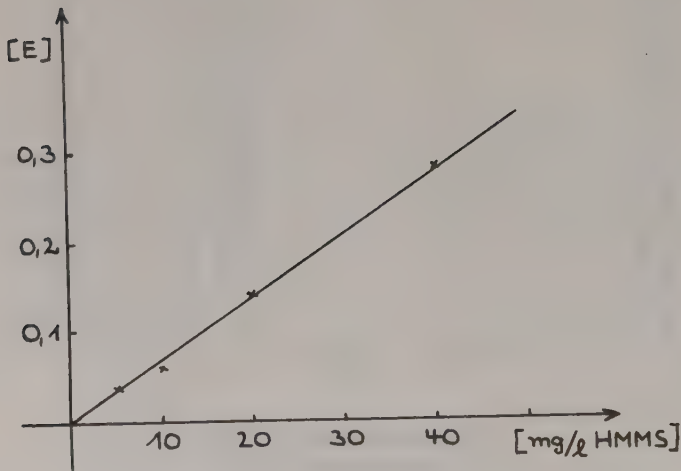
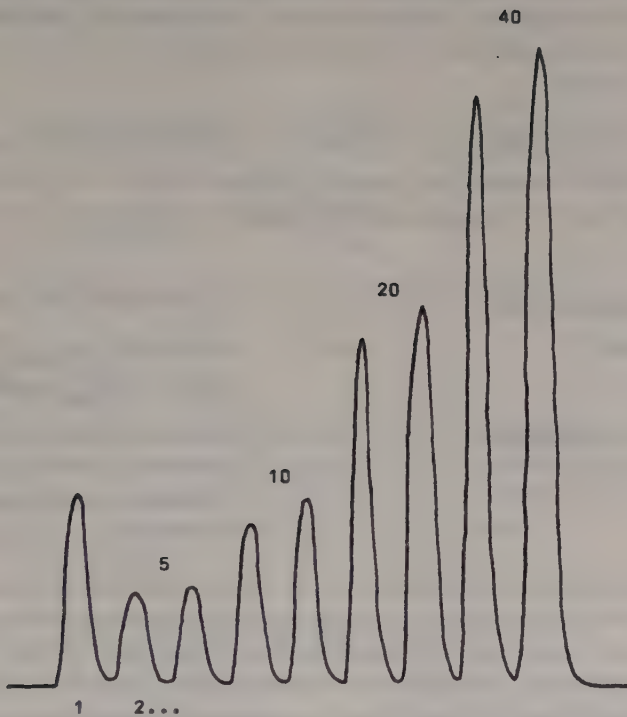


Abb.21: Eichkurve



1 = "direkter" HMMS-Standard 5 mg/l (nur im HMMS-Analyseator gelaufen)

2 = "indirekte" HMMS-Standards für die Eichkurve (5-40 mg/l)

Abb. 22: Extinktionskurven für die Eichkurve

3. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens und der Einzelgeräte zu bekommen, wurden Standardproben (hintereinander oder mit Wasser- bzw. Urinproben dazwischen) an einem Tag oder über mehrere Tage hinweg ausgewertet. Zuerst wurde der Mittelwert der Peaks ($\bar{x}$) und die Varianz (nach der Formel:

$$s^2 = \frac{\sum x^2}{n-1} - \frac{(\sum x)^2}{n(n-1)} ; n = \text{Zahl der Fälle})$$

berechnet, hieraus wiederum der Variabilitätskoeffizient (VK); der VK mit 100 multipliziert ergab schließlich die Reproduzierbarkeit in Prozent.

<u>Gesamtverfahren:</u>	R = 8,13 %	(n=18; Standard 40 mg/l)
<u>Examet:</u>	R = 7,94 %	(berechnet nach der Formel: $R_{Ex} = \sqrt{R_{Ges}^2 - R_{HMMS}^2}$)
<u>HMMS-Analysator:</u>	R = 1,75 %	(Mittelwert aus 4 Messungen zwischen 1,19% u. 2,65%; Standard 20 und 5 mg/l; n = 99)

Beim HMMS-Analysator wurde zusätzlich eine der Ursachen der Schwankungen näher untersucht: die angesaugte Probenmenge. Die Reproduzierbarkeit betrug zwischen 0,3 und 4 %. Die Fehlerbreite war dabei umso größer, je länger die Auswertung lief (0,3% bei 7 hintereinander laufenden Standardproben an 1 Tag, 4% bei 20 Standardproben ,die über 4 Tage hinweg jeweils zwischen 14-18 Urinproben liefen).

4. Verschleppung

Die Verschleppung wurde folgendermaßen berechnet: 2 Standardproben liefen hintereinander durch beide Apparate. Der 1.Peak wurde gleich 100 % gesetzt und der 2.Peak daran gemessen.

<u>Examet:</u>	10,65 % (8,2 - 16,4 %)
<u>HMMS-Analysator:</u>	praktisch keine Verschleppung

Für den Arbeitsbetrieb ist es notwendig, den Verschleppungsfaktor des Systems zu kennen und ihn zu korrigieren. Dies geschieht auf folgende

Weise: Es sei die Reihenfolge der Peaks: $P_0, S_1, S_2, P_n, P_{n+1}, \dots$, wobei S_1 und S_2 gleiche Standardproben und P Urin- oder Wasserproben sind. Dann ist der Verschleppungsfaktor des Systems

$$VF = \frac{S_2 - S_1}{S_2 - P_0} ;$$

um einen gemessenen Extinktionswert zu korrigieren, rechnet man:

$$P_{n+1}(\text{wahr}) = \frac{P_{n+1}(\text{gemessen}) - VF \cdot P_n}{1 - VF} ;$$

Die Ableitung dieser Formeln ist im Anhang angegeben.

5. Ausbeute

Die Extraktionsausbeute (mit korrigierter Verschleppung) betrug im Vergleich zum direkt im HMMS-Analysator gemessenen Standard 47,2 %. Sie konnte inzwischen - nach Abschluß dieser Arbeit - mit einem weiter verbesserten Gerät auf etwa 80 % gesteigert werden.

6. Konzentrationsbereich der HMMS im Urin

Es wurden Werte zwischen 0,07 und 0,8 mg%, die Mehrzahl davon im unteren Bereich, gemessen. Bei einer täglichen Harnmenge von etwa 1500 ml beträgt die HMMS-Ausschüttung dann ca. 1-12 mg/24 Std. Diese Werte liegen etwas niedriger als die von Woitwod/Knight³ und Georges/Small⁴ gefundenen, entsprechen aber denen, die in der deutschen Literatur¹ angegeben sind.

F. Diskussion

I. Zu den technischen Schwierigkeiten

Die rein technischen Schwierigkeiten boten das größte Problem dieser Arbeit und sind auch jetzt zum Teil nur gerade zufriedenstellend gelöst. Druckschwankungen, Oberflächenspannungen, Luftblasen, Temperaturunterschiede, Verdunstung, Materialabnutzung u.a. führten oft zu falschen und damit auch falsch interpretierten Ergebnissen. Es dauerte manchmal lange, bis der wahre Fehler unter den vielen möglichen gefunden war. Dazu kam,

daß beim Extraktionsautomaten überhaupt nicht, beim HMMS-Analysator nur in geringem Maße auf die Erfahrungen mit bisher entwickelten Auto-Analysern zurückgegriffen werden konnte (aggressive Chemikalien, beim HMMS-Analysator Übergang von bisher üblicher Luft-Flüssig-Segmentation in die Flüssig-Flüssig-Segmentation). So wird trotz des momentan fast problemlosen Funktionierens der Geräte weitere Erprobungsarbeit mit normiert hergestellten Versuchsgeräten notwendig sein.

II. Zu den Ergebnissen

a) Zur Spezifität

Die Methode ist gut spezifisch für 2 Endprodukte des Katecholaminabbaus, nämlich HMMS und Vanillinsäure. Da letztere über dieselbe Vorstufe wie HMMS entsteht (4-Hydroxy-3-methoxy-phenylglycolaldehyd), im Urin jedoch in viel geringerer Konzentration vorhanden ist (radioaktiv markiertes Adrenalin wird zu 41,2 % als HMMS und nur zu 7,1 % als 4-Hydroxy-3-methoxy-phenylglycolsulfat, der direkten Vorstufe von Vanillinsäure, im Urin ausgeschieden¹), wird das Meßergebnis für die HMMS allein nur sehr wenig - und dann immer in einem konstanten Verhältnis - verfälscht.

b) Zur Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit ist - besonders beim Extraktionsautomaten - nicht allzu gut; über einen längeren Zeitraum gemessen, wird sie auch beim HMMS-Analysator schlechter. Die über einen Tag hinausgehenden Schwankungen können allerdings durch die mitlaufenden direkten und indirekten Standardproben eliminiert werden, so daß die Reproduzierbarkeit für das gesamte System letztlich konstant bleibt; wesentlich verbesserungsfähig scheint sie mir jedoch nicht mehr zu sein.

c) Zur Ausbeute

Die Ausbeute hängt von den Verteilungskoeffizienten zwischen den einzelnen Extraktionslösungen sowie von dem Prozentsatz an HMMS ab, der während des Extrahierens verloren geht, schließlich noch von der Konzentration, die die HMMS in der Na-Azetat-Lösung aufweist. Die letzteren 2 Werte könnten durch Experimentieren mit anderen Glaskolbengrößen noch verbessert werden. Die Kontaktzeiten der einzelnen Lösungen reichen bei dem gewählten 7-Minuten-Zyklus für die Einstel-

lung des Konzentrationsgleichgewichts voll aus (Stehenlassen des Apparates über die Mittagspause ergab keine vergrößerte Ausbeute). Bei einem Nachfolgegerät wäre eventuell eine Reduzierung der Kontaktzeiten zu überlegen, um dadurch eine größere Durchsatzrate zu erzielen.

G. Zusammenfassung

Es wird eine neue automatische Methode zur Bestimmung von 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure (HMMS) im Urin angegeben. Anlaß für die Entwicklung war eine Studie über den Einfluß von Klimafaktoren auf die Katecholamin-Ausschüttung, die die Bestimmung der HMMS in ca. 2000 Urinproben erforderte. Grundlage ist das Handverfahren von Woiwod und Knight³, modifiziert nach Georges und Small⁴. Die Extraktion der HMMS und ihre Bestimmung wird mit 2 voneinander unabhängigen Geräten ausgeführt, die teils (Extraktion) auf einem neuen Prinzip, teils (Bestimmung) auf der Auto-Analyzer-Basis beruhen. Technische Schwierigkeiten sind noch nicht optimal gelöst.

<u>Durchsatzrate:</u>	Extraktionsautomat: 4 Urine/Stunde
	HMMS-Analysator: 16 Urine/Stunde

<u>Arbeitsbereich:</u>	0,05 - 5 mg% (nach oben erweiterungsfähig)
------------------------	--

<u>Normalwerte der HMMS im Urin:</u>	0,07 - 0,8 mg%;
	± 1 - 12 mg/24 Stunden

Das Verfahren zeichnet sich durch eine gute Spezifität aus; Reproduzierbarkeit, Durchsatzrate und Ausbeute sind eventuell noch verbesserungsfähig.

Parallel zur HMMS-Bestimmung wurde eine Kreatinin-Bestimmung (mit dem Kreatinin-Auto-Analyser, Fa. Technicon) durchgeführt, um eine normierte HMMS-Ausscheidung zu berechnen.

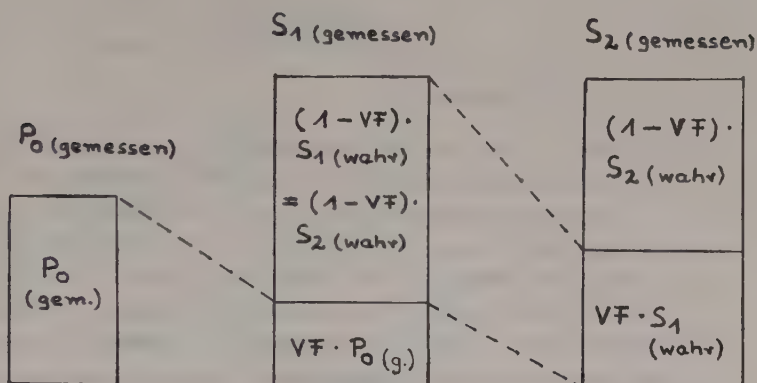
H. Literatur

- 1 : Documenta Geigy: Wissenschaftl. Tabellen, Geigy A.G., Pharma, Basel, S. 720 ff (1968)
- 2 : Kakac u. Vejdelek: Hdb. d. Kolorimetrie, Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd. III/1, S. 743-746 (1966)
- 3 : Woiswod/Knight: The determination of 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid in urine, in : J.Clin.Pathol. 14,502 (1961)
- 4 : Georges/Small: The determination of 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid in urine, in : J.clin.Pathol. 15,788 (1962)
- 5 : H.Beyer: Lehrb.d.org.Chemie, Hirzel verlag,Leipzig,S.458 ff (1963)
- 6 : P.Karrer: Lehrb.d.org.Chemie,Thieme Verlag,Stuttgart,S.518 ff (1950)
- 7 : H.Pratzel: Ein Gerät zur automatischen Urinextraktion mit anschließender kontinuierlicher Bestimmung von 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure u. von 17-Ketosteroiden, in: Z.klin.Chem.u.klin.Biochem., 8,364 (1970)
- 8 : W.Siegenthaler: Klinische Pathophysiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, S.728 (1970)
- 9 : H.Pratzel: Eine neue Methode zur fortlaufenden In-vivo-Analyse von Stoffwechselvorgängen in der Epidermis, in: Automation in analytical chemistry, Mediad Inc.,New York, Bd.II, S.209 ff (1967)

I. Anhang

Ableitung der Formeln von S.29 (E.4.):

1. Verschleppungsfaktor (VF): Es seien folgende Peaks gegeben: P_0 = Urinprobe, S_1 und S_2 = gleiche Standardproben



Unter der Annahme, daß die Verschleppung sich nur bis zur nächsten Probe hin bemerkbar macht (entsprechend der experimentellen Befunde) und der Verschleppungsfaktor konstant ist, ist

$$S_1(\text{gem}) = (1 - VF) \cdot S_2(\text{wahr}) + VF \cdot P_0(\text{gem}) ;$$

$$S_2(\text{gem}) = (1 - VF) \cdot S_2(\text{wahr}) + VF \cdot S_1(\text{wahr}) ;$$

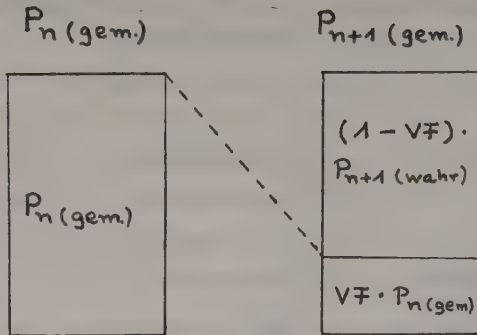
Da $S_1(\text{wahr}) = S_2(\text{wahr})$, ist $S_2(\text{gem}) = S_2(\text{wahr})$ und damit

$$S_1(\text{gem}) = (1 - VF) \cdot S_2(\text{gem}) + VF \cdot P_0(\text{gem}) ;$$

Es wird nach VF aufgelöst und mit (-1) durchmultipliziert:

$$VF = \frac{S_2(\text{gem}) - S_1(\text{gem})}{S_2(\text{gem}) - P_0(\text{gem})} ;$$

2. Korrigierter Extinktionswert:

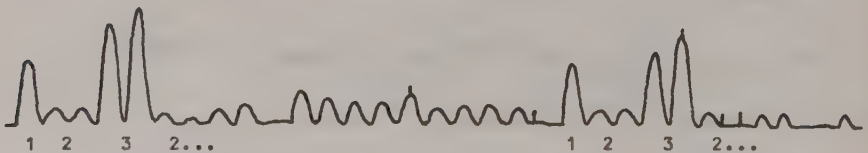


Es ist: $P_{n+1}(\text{gem.}) = (1 - VF) \cdot P_{n+1}(\text{wahr}) + VF \cdot P_n(\text{gem.})$;

Nun wird nach $P_{n+1}(\text{wahr})$ aufgelöst:

$$P_{n+1}(\text{wahr}) = \frac{P_{n+1}(\text{gem.}) - VF \cdot P_n(\text{gem.})}{1 - VF} ;$$

Extinktionskurve eines Arbeitslaufs :



1 = HMMS-Standard 5 mg/l, nur durch HMMS-Analysator gelaufen

2 = Urinproben

3 = HMMS-Standard 20 mg/l, auch durch den EXAMAT gelaufen

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Dr. rer. nat. H. Pretzel, der mir das Thema überließ und die auftauchenden theoretischen und praktischen Schwierigkeiten überwinden half.

Meinen Dank aussprechen möchte ich ferner Herrn Professor Dr. med. H. Drexel, der durch seine unbürokratische und herzliche Art wesentlich zum schnellen Abschluß dieser Arbeit beitrug, sowie Herrn Dipl. Phys. K. Dirnagl und den Mitarbeitern des Instituts für Balneologie und Klimatologie, die das praktische Gelingen der Versuche ermöglichten.

Lebenslauf

1948, 11.April: geboren in München

1954, Herbst: Eintritt in die Volksschule (München)

1958, Herbst: Übertritt in das Wittelsbacher Gymnasium München
(humanistische Abteilung)

1967, 21.Juli: Abitur

1967, Wintersemester: Aufnahme des Medizinstudiums an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

1973, 21.Dezember: Abschluß des Medizinischen Staatsexamens

1974, 1.März bis 30.Juni: Medizinalassistent auf der chirurgischen
Abteilung des Städt. Krankenhauses Bad Tölz

1974, ab 1.November: Medizinalassistent auf der gynäkologischen
Abteilung des Städt. Krankenhauses Bobingen



